

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert-Koch-Institutes Berlin

Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

WIRKUNG EINER UNSPEZIFISCHEN ORALEN
IMPFUNG MIT BIFIDUSBAKTERIEN
AM MODELL DER ORALEN
S.TYPHI MURIUM - UND
INTRAPERITONEALEN E. COLI - INFEKTION
DER MAUS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gabriele Westendorf geb. Müller
aus Berlin

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553616_0004

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert-Koch-Institutes Berlin

Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

WIRKUNG EINER UNSPEZIFISCHEN ORALEN
IMPFUNG MIT BIFIDUSBAKTERIEN
AM MODELL DER ORALEN
S.TYPHI MURIUM - UND
INTRAPERITONEALEN E. COLI - INFEKTION
DER MAUS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gabriele Westendorf geb. Müller

aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. H. R a e t t i g

Korreferent: Professor Dr. med. Bernh. S c h m i d t

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 30.5.1972



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	4
I. Versuchstiere	4
II. Impfstoffe	4
III. Immunisierungsart	5
IV. Infektion	5
C. Ergebnisse	6
I. Ergebnisse nach Infektion mit S.typhi murium	6
II. Ergebnisse nach Infektion mit E.coli 2380	13
D. Diskussion	21
E. Zusammenfassung	30
F. Literatur	31

A. Einleitung

Orale Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S.typhi murium*-Bakterien und mit hitzeinaktivierten Colibakterien der Dyspepsiegruppe und der gute Schutzeffekt nach nachfolgender Infektion mit dem homologen virulenten Bakterium - virulente *S.typhi murium*- und virulente *E.coli*-Bakterien - sind schon länger bekannt (6, 7, 12, 13, 21, 23, 24, 28, 34, 36, 45). Auch die unspezifische Immunisierung zeigte zum Teil positive Ergebnisse (5, 15, 24, 29, 37). Doch da die Ergebnisse nach unspezifischer Immunisierung noch zu keinem zufriedenstellenden Resultat geführt haben, soll in dieser Arbeit noch einmal darauf eingegangen werden. Wegen der eigentlich immer guten Ergebnisse nach spezifischer oraler Immunisierung wurde diese Immunisierungsmethode, sozusagen als zweite Kontrolle, neben den unbehandelten Kontrolltieren, mit dazugenommen. Als neuer Impfstoff, neben dem hitzeinaktivierten *S.typhi murium*- und dem hitzeinaktivierten *E.coli* 2380-Impfstoff, sollte einer aus Bifidusbakterien geprüft werden, einmal in vermehrungsfähiger und zum anderen in hitzeinaktivierter Form.

Ein Impfstoff aus Bifidusbakterien wurde gewählt, da diese Bakterien von den meisten Autoren als apathogen erkannt wurden. Nur BOVENTER (3) schreibt ihnen höchstens ein Mitwirken bei der Entstehung der Zahnkaries zu.

Um die Bifidusforschung bemühten sich vor allem die Pädiater, seitdem TISSIER (49) 1900 den "*Bacillus bifidus communis*" aus dem Säuglingsstuhl züchten konnte. Immer wieder betonten die Autoren, daß eine Abhängigkeit zwischen dem Absinken oder gar Verschwinden der Bifidusflora des Stuhles und dem Auftreten von Dyspepsien, Ernährungsstörungen und anderen Erkrankungen des Gastro-Intestinal-Traktes besteht (1, 3, 4, 8, 11, 9, 22, 26, 33, 46, 47, 50). Demzufolge wurde verschiedentlich versucht, Bifidusbakterien als Therapeutikum einzusetzen, besonders gegen die durch Dyspepsiecoli hervorgerufenen Dyspepsien.

ADAM (1) sieht in der Brustmilchabgabe an nicht muttermilch-gestillte Säuglinge schon einen natürlichen Selbstreinigungs-mechanismus, da die Colivegetation durch Bifidusüberwucherung stark in den Hintergrund tritt. HEYNEN (9) beschreibt eine bifidogene Nahrung auf Milchgrundlage. Sie enthält Bakterium bifidum und seine Stoffwechselprodukte. Er nennt sie indiziert bei Antibiotika-, Sulfonamid- und Strahlenschäden, Intestinal-erkrankungen und Darmfunktionsstörungen, außerdem - aufgrund des Aminosäureverwertungsvermögens von B. bifidum - bei Leber- und Gallenblasenerkrankungen, bei Lebercirrhose zur Senkung des Blut-Ammoniakspiegels. KUNDRATITZ (22) empfiehlt ein Dextrin-Cytin-Präparat namens Dexamyl. Er sieht im B. bifidum als Anta-gonisten der pathogenen Colistämme einen Heilfaktor. MAYER (26) erkennt in der Bifidumflora des Dickdarmes eine Schutzfunktion ge-gen die Ansiedlung von Staphylokokken, Dyspepsiecoli und ande-ren pathogenen Darmbakterien. Er spricht ihr große Wichtigkeit zu, solange sich der immunbiologische Aufbau der jungen Säug-linge noch im Entstehen befindet. Deswegen tritt er für eine Ernährungsmethode mit Lactana-B-Bifidummilch-Nahrung ein.

REUTER (41) hat die Bifidumflora nach Gabe von Muttermilch, Stutenmilch und Kuhmilch untersucht. In der genannten Reihen-folge sah er ein Abnehmen der Bifidusflora. SCHULER (46) be-richtet von einer Substitutionstherapie (B. bifidus-Reinkultur unter gleichzeitiger Verabreichung von optimalen Nährböden) bei enteraler "Dysbiose". SITTLER (47) berichtete 1908, wohl als erster, daß es mittels Verabreichung von Dextrose leicht gelingt, die sogenannte physiologische B. bifidus-Flora hervor-zurufen. Allerdings sieht er auch, daß die Gabe von Lakzobazillen nicht in jedem Falle von einem Auftreten oder Überwiegen der Bifidusflora im Stuhle begleitet wird. VLCEK und KNEIFL (50) hatten gute Erfahrungen mit der Gabe von Omniflora an Früh-geborene. Omniflora enthält drei der wesentlichsten Darmkeime: L. acidophilus, L. bifidus und E. coli.

In dieser Arbeit soll nun B. bifidus nicht als Substitutions-therapie dienen, sondern es soll auf seine möglicherweise un-spezifisch-immunisierende Wirkung hin geprüft werden. Denn es

könnte sein, daß diese Bakterien die Fähigkeit besitzen, die in der Darmwand gelegenen unspezifischen Abwehrmechanismen anzuregen. Als Modell dient die Maus, die mit einem menschen-eigenen Bifidusbakterium immunisiert wird, das in ihrem Darm nicht obligat ist (27). Nach Untersuchungen von MITSUOKA (27) entsprechen die aus Tieren isolierten Bifidusbakterienstämme den beim Menschen angetroffenen Spezies oder Biotypen nicht.

Zur Infektion wurden einmal virulente S.typhi murium-Bakterien oral verimpft. Für die S.typhi murium-Infektion ist die Maus als Modell günstig, da der Aufnahmemodus und der Krankheitsverlauf dem des Menschen ähnlich sind.(6). Zum anderen wurde mit virulenten E.coli-Bakterien mit der Antigen-Formel O 111 : B 4 : H 12 intraperitoneal infiziert. Dieser Infektionsweg entspricht nicht dem des Menschen, der sich wie mit Salmonellen auch mit Dyspepsiecoli auf oralem Wege infiziert. Da aber die orale Infektion der Maus gar keinen pathogenen Effekt zeigt, wurde die atypische Belastung des intraperitonealen Weges gewählt. Auf diese Weise resultieren Infektionen, die zum Tode der Tiere führen können (23, 28).

Weiter soll dann, im Hinblick auf die unspezifische Immunisierung, der Schutzeffekt nach Immunisierung mit ~~hitze~~inaktivierten E.coli-Bakterien und nachfolgender oraler Infektion mit S.typhi murium-Bakterien und außerdem nach Immunisierung mit hitzeinaktivierten S.typhi murium-Bakterien und nachfolgender intraperitonealer Infektion mit E.coli-Bakterien untersucht werden.

B. Material und Methoden

I. Versuchstiere

Die Versuche wurden an weißen NMRI-Mäusen, die aus der Zucht des Robert-Koch-Institutes stammten, ausgeführt. Die Tiere, die nach Geschlecht getrennt waren, wurden in Gruppen zu 25 in einem Käfig gehalten. Zu Beginn des Versuchs lag das Gewicht der Tiere bei 16 - 18 g. Als Nahrung erhielten sie Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser. Alle Kontrolltiere wurden unter denselben äußeren Bedingungen gehalten.

II. Impfstoffe

Es wurden vier verschiedene Impfstoffe verwendet:

1. hitzeinaktivierte *Salmonellae typhi murium*

Vierundzwanzig Stunden alte, bei 37° C auf einfachen Agarplatten gebrütete *S.typhi murium*-Kulturen wurden mit Phosphat-gepuffertem NaCl-Lösung von den Agarschalen weggeschwemmt. Nach der Keimzählung wurde der Titer auf 10⁹ Keime/ml eingestellt. Dann wurde die Kultur für drei Minuten bei 100° C hitzeinaktiviert. Es folgte eine zehntägige Sterilitätskontrolle, bei der 0,1 ml des Impfstoffes in 200 ml Bouillon gebracht, bei 37° gehalten und beobachtet wurde.

2. vermehrungsfähige *Bifidusbakterien*

Der *Bifidus*impfstoff wurde von der MED-Fabrik in Berlin hergestellt. Dort wurde er auf einem Hochschichtagar der Firma DIFCO (Micro Inoculum Broth) gezüchtet. Dieser *Bifidus*stamm gehört zum Typ *Bakterium longum* Tyb b nach dem Differenzierungsergebnis von MITSUOKA (27). Die Titer lagen immer bei 10⁹ Keimen/ml.

3. hitzeinaktivierte *Bifidusbakterien*

Es wurde der gleiche Impfstoff, der von der MED-Fabrik geliefert wurde, wie der bei 2. verwandt. Nur wurde er für drei Minuten bei 100° C hitzeinaktiviert.

4. hitzeinaktivierte *E.coli*

Es wurde ein Impfstoff aus dem Stamm 2380 (ROWLEY) hergestellt. Der Titer wurde auf 10⁹ Keime/ml eingestellt. Die Hitzeinaktivierung erfolgte ebenfalls bei 100° C für drei Minuten.

III. Immunisierungsart

Zu jedem Versuch wurden die Mäuse in vier Gruppen geteilt. Der Impfmodus war folgender: täglich 0,25 ml Impfstoff, oral mit der Sonde gegeben; dieses an zehn aufeinanderfolgenden Tagen. Sie erhielten in

Gruppe 1: den hitzeinaktivierten *S.typhi murium*-Impfstoff

Gruppe 2: den vermehrungsfähigen Bifidus-Impfstoff

Gruppe 3: den hitzeinaktivierten Bifidus-Impfstoff

Gruppe 4: den hitzeinaktivierten *E.coli*-Impfstoff.

IV. Infektion

Am 10. Tag nach der letzten Immunisierung wurde die eine Hälfte der Gruppen 1 - 4 mit 0,25 ml einer 24-stündigen Brühekultur von virulenten *S.typhi murium*-Bakterien oral mit der Sonde infiziert. Die andere Hälfte der Gruppen 1 - 4 wurde mit 0,1 ml des virulenten *E.coli* 2380-Stammes intraperitoneal infiziert. Mit den Kontrolltieren wurde ebenso verfahren: die eine Hälfte der Tiere wurde mit *S.typhi murium*-Bakterien infiziert, die andere mit *E.coli*-Bakterien.

Die Keimzahlen bei den einzelnen Versuchen waren folgende:

Nr. des Versuchs	<i>S.typhi murium</i> virulent	<i>E.coli</i> 2380 virulent
I	$5,1 \cdot 10^8$ Keime/ml	$2,8 \cdot 10^8$ Keime/0,1 ml
II	10^9 Keime/ml	10^9 Keime/0,1 ml
III	$4,5 \cdot 10^8$ Keime/ml	$4,2 \cdot 10^8$ Keime/0,1 ml
IV	$7,3 \cdot 10^8$ Keime/ml	10^8 Keime/0,1 ml
V	$6,2 \cdot 10^8$ Keime/ml	$5,5 \cdot 10^8$ Keime/0,1 ml
VI	$4 \cdot 10^8$ Keime/ml	$5 \cdot 10^8$ Keime/0,1 ml
VII	$4 \cdot 10^8$ Keime/ml	$3,8 \cdot 10^8$ Keime/0,1 ml

C. Ergebnisse

In sieben Versuchsreihen, die von November 1969 bis Juni 1970 dauerten und 3715 Mäuse umfaßten, wollte ich einen Impfschutz gegen eine E.coli 2380- bzw. S.typhi murium-Infektion prüfen. Zum Nachweis eines Impfschutzes wurde die Anzahl der Todesfälle der immunisierten Tiere mit der der Kontrolltiere verglichen. Zur statistischen Sicherung benutzte ich den χ^2 - 4 - Felder-Test (43), außerdem die höchstzulässige Zufallsdifferenz nach KOLLER (19). Mit diesem Wert und der Größe D_b = beobachtete Differenz zwischen der Mortalität der Kontrolltiere und der Immuntiere, konnte ich den Grad der statistischen Echtheit = E errechnen: $E = D_b/D_z$. Ist E größer als 1 und die Irrtumswahrscheinlichkeit, die man nach dem χ^2 - 4 - Felder-Test berechnet, kleiner als 5 %, so ist der Mortalitätsunterschied der Immun- und Kontrolltiere statistisch gesichert.

I. Ergebnisse nach Infektion mit S.typhi murium-Bakterien

Bei der Zusammenfassung aller Versuche ließ ich jeweils den Versuch VI weg, da die Mortalität der Kontrollen nur bei 10 % lag, die der immunisierten Tiere allerdings war niedriger. Der Titer des Infektionsmaterials war wie bei allen Versuchen auf 10^8 Keime/ml eingestellt. Demnach ist das Infektionsmaterial nicht virulent genug gewesen. Sonst wertete ich alle Versuche, wenn auch bei den Immunisierungen mit Bifidus- und Colibakterien "Ausreißer" dabei gewesen sind, d.h. die Mortalitätsrate der immunisierten Tiere lag höher als die der Kontrolltiere. In der Abb. 1, S. 12, sind die Mortalitätskurven in der Zusammenfassung aller gewerteten Versuche, bei denen mit S.typhi murium-Bakterien infiziert wurde, dargestellt.

Bei den mit S.typhi murium, also spezifisch immunisierten Tieren ergab sich der beste Schutz. In der Einzelauswertung der Versuche war nur einer, Versuch III, statistisch signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 3 %. In der Zusammenfassung aller Versuche war die Irrtumswahrscheinlichkeit 0,1 %, D_b war 13,6 % und D_z 8 %, E betrug dann 1,7 (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Ergebnisse und statistische Angaben für die Versuche mit spezifischer oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S. typhi* murium-Bakterien und oraler Infektionsbelastung mit virulenten *S. typhi* murium-Bakterien

Versuch Nr.	mit <i>S. typhi</i> murium infizierte Mäuse		Kontrollen		statistische Angaben		
	n	† %	n	† %	W	Db/ Dz	E I
I	50	18 36,0	48	25 52,08	30,8	-	- -
II	75	22 29,33	75	23 30,68	4,4	-	- -
III	50	12 24,0	52	23 44,22	45,7	-	- 3 %
IV	46	18 39,13	29	18 62,08	36,9	-	- -
V	49	11 22,44	47	18 40,87	45,0	-	- 9 %
VII	48	12 24,96	50	22 44,0	43,2	-	- -
Summe	318	93 29,2	301	129 42,8	31,8	13,6/ 8,0	1,7 < 0,1 %

n = Anzahl der Mäuse

† = Zahl der gestorbenen
Mäuse nach Infektion

% = Endmortalität in %

W = Wirkungsindex

Db = beobachtete Differenz
(s. Seite 6)

E = statistische Echtheit
(s. Seite 7)

I = Irrtumswahrscheinlichkeit in %

Dz = höchstzulässige Zufallsdifferenz (s. Seite 6)

Von den unspezifischen Immunisierungen konnte der vermehrungsfähige Bifidusimpfstoff am besten schützen. Er kam nahe an die Ergebnisse des *S. typhi murium*-Impfstoffes heran. Bei der Bewertung der einzelnen Versuche erreichten zwei statistische Signifikanz, nämlich Versuch II mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2,6% und Versuch III mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1%. Versuch V war ein "Ausreißer", so daß bei der Zusammenfassung aller Versuche sich nur eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,5% ergab. E ist 1,33, da für Db 10,8% und für Dz 8,1% ermittelt wurden (s. Tabelle 2).

Der hitzeinaktivierte Bifidusimpfstoff hatte in der Einzelwertung auch zwei Versuchsergebnisse, die statistische Signifikanz zeigten. Das sind Versuch III mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1% und Versuch IV mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 3%. Da in dieser Versuchsreihe aber zwei "Ausreißer", Versuch II und V, sind, ist E in der Zusammenfassung nur 0,9 und die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 5%.

Die Signifikanzgrenze liegt nach den Berechnungen von VOLLER höher als bei dem χ^2 -4-Felder-Test. Denn benutzt man nur die Irrtumswahrscheinlichkeit zur statistischen Sicherung, so muß man dem hitzeinaktivierten Bifidusimpfstoff einen - wenn auch geringen - Schutz zusprechen. Dagegen erreicht E mit 0,9 keine statistische Signifikanz. Nach Beachtung dieser beiden unterschiedlichen Ergebnisse kann man bei diesem Impfstoff doch einen geringen Schutzwert erkennen, da man ja auch die recht erfolgreichen Einzelversuche berücksichtigen muß. Diese haben nur durch die beiden "Ausreißer" in der Gesamtwertung dann ein schlechteres Bild ergeben. (s. Tabelle 3).

Nach der Immunisierung mit *E. coli* 2380-Bakterien ist in keinem Versuch und auch nicht in der Gesamtwertung eine statistische Sicherung errechnet worden. Dieser Impfstoff bietet also keinen Schutz gegen eine Infektion mit *S. typhi murium*-Bakterien. Auch wenn man die beiden "Ausreißer" -Versuche I und V unberücksichtigt ließe, ergäbe sich kein statistisches gesichertes Ergebnis (s. Tabelle 4).

Tabelle 2: Ergebnisse und statistische Angaben für die Versuche mit unspezifischer oraler Immunisierung mit vermehrungsfähigen Bifidusbakterien und oraler Infektionsbelastung mit virulenten *S. typhi murium*-Bakterien
(Erklärungen der Überschriften s. Tabelle 1, Seite 7)

Versuch Nr.	mit verm. Bifidus- bakterien immuni- sierte Mäuse			Kontrollen			statistische Angaben			
	n	†	%	n	†	%	W	D _b / D _Z	E	I
I	50	23	46	48	25	52,08	11,5	-	-	-
II	75	8	10,67	75	23	30,68	65,2	-	-	2,6 %
III	50	7	14,0	52	23	44,22	68,4	-	-	< 0,1 %
IV	55	28	50,9	29	18	62,08	19,3	-	-	-
V	47	23	48,99	47	18	40,87	-	-	-	-
VII	50	16	32,0	50	22	44,0	27,2	-	-	-
Summe	327	105	32,02	301	129	42,8	25,2	10,8/ 8,1	1,33	0,5 %

Tabelle 3: Ergebnisse und statistische Angaben für die Versuche mit unspezifischer oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten Bifidusbakterien und oraler Infektionsbelastung mit virulenten *S. typhi murium*-Bakterien
(Erklärungen der Überschriften s. Tabelle 1, Seite 7)

Versuch Nr.	mit hitzeinakt. Bifidusbakterien immunisierte Mäuse			Kontrollen			statistische Angaben			
	n	†	%	n	†	%	W	Db/ DZ	E	I
I	50	19	38,0	48	25	52,08	27	-	-	-
II	75	29	38,66	75	23	30,68	-	-	-	-
III	50	7	14,0	52	23	44,22	68,4	-	-	< 0,1 %
IV	54	20	37,03	29	18	62,08	40,3	-	-	3 %
V	49	22	44,88	47	18	40,87	-	-	-	-
VII	49	19	38,76	50	22	44,0	11,9	-	-	-
Summe	327	116	35,38	301	129	42,8	17,4	7,44/ 8,2	0,9	5 %

Tabelle 4: Ergebnisse und statistische Angaben für die Versuche mit unspezifischer oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten *E.coli* 2380-Bakterien und oraler Infektionsbelastung mit virulenten *S.typhi murium*-Bakterien
(Erklärungen der Überschriften s. Tabelle 1, Seite 7)

Versuch Nr.	mit hitzeinaktivierten <i>E.coli</i> -Bakterien immu- nisierte Mäuse			Kontrollen			statistische Angaben			
	n	†	%	n	†	%	W	Db/ DZ	E	I
I	47	25	53,18	48	25	52,08	-	-	-	-
II	71	20	28,17	75	23	30,68	8,1	-	-	-
III	49	14	28,57	52	23	44,22	35,3	-	-	-
IV	53	25	47,15	29	18	62,08	22,4	-	-	-
V	45	22	48,4	47	18	40,87	-	-	-	-
VII	48	21	43,68	50	22	44,0	3,0	-	-	-
Summe	313	127	40,64	301	129	42,8	5,1	2,2/ 8,4	0,25	58 %



Abbildung 1

Anstieg der Mortalität nach oraler Infektion mit virulenten *S. typhi* murium bei 318 mit hitzeinaktivierten *S. typhi* murium, 327 mit vermehrungsfähigen Bifidusbakterien, 327 mit hitzeinaktivierten Bifidusbakterien und 313 mit hitzeinaktivierten *E. coli* 2380 oral geimpften Mäusen und 301 nicht geimpften Kontrollmäusen. Zusammenfassung der Versuche I-V und VII.

Da weder bei den Versuchsreihen, bei denen mit *S.typhi murium*-Bakterien infiziert wurde, noch bei denen, bei denen mit *E.coli*-Bakterien infiziert wurde, keine einzige nur "Ausreißer" hatte, habe ich auch diese Versuche mit in die Zusammenfassung der Einzelversuche genommen. So habe ich es ja schon bei den besprochenen Versuchen, bei denen mit *S.typhi murium*-Bakterien infiziert wurde, getan. Es fällt allerdings auf, daß bei den Tieren, die mit dem spezifischen Impfstoff immunisiert wurden, nie "Ausreißer" auftraten. Sonst war bei den Tieren, die mit einem unspezifischen Impfstoff immunisiert und mit *S.typhi-murium*-Bakterien infiziert wurden, im Versuch V einheitlich die Mortalität der Immuntiere über der der Kontrolltiere; bei den mit *E.coli* 2380 infizierten Tieren war dies entsprechend im Versuch II so.

II. Ergebnisse nach Infektion mit *E.coli* 2380-Bakterien

Bei der Zusammenfassung der Einzelversuche ließ ich den I. und IV. Versuch weg, da die Mortalität der Kontrolltiere nur 10 % (Versuch I) und bei Versuch IV sogar nur 1,96 % betrug. Das Infektionsmaterial war nicht virulent genug. In der Abbildung 2 sind die Mortalitätskurven in der Zusammenfassung aller gewerteten Versuche, bei denen mit *E.coli* 2380 infiziert wurde, dargestellt (s. Seite 19).

Die spezifische Immunisierung mit *E.coli* 2380 hat in allen Einzelversuchen Ergebnisse mit hochsignifikanten Werten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ist bei jedem Versuch kleiner als 0,1 %, in der Gesamtwertung dann natürlich auch kleiner als 0,1 %. E beträgt hier 11,79 (s. Tabelle 5).

Bei den unspezifischen Immunisierungen kann man mit Vorbehalt dem hitzeinaktivierten Bifidusimpfstoff einen geringen Schutz zusprechen. E ist 0,9, die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt aber unter 5 %, nämlich bei 4,5 % (s. Tabelle 6). Dieses unerwartet gute Ergebnis resultiert sicher daher, daß in diesen Versuchsreihen nur Versuch II ein "Ausreißer" ist, während bei dem vermehrungsfähigen Bifidusimpfstoff zwei "Ausreißer" vorkommen (Versuch II und VI). Denn gewöhnlich schützt der vermehrungsfähige Impfstoff besser als der hitzeinaktivierte (KINNE, 17).

Tabelle 5: Ergebnisse und statistische Angaben für die Versuche mit spezifischer oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten E.coli 2380-Bakterien und intraperitonealer Infektionsbelastung mit virulenten E.coli 2380-Bakterien
(Erklärungen der Überschriften s. Tabelle 1, Seite 7)

Versuch Nr.	mit hitzeinaktivierten E.coli-Bakterien immu- nisierte Mäuse			Kontrollen			statistische Angaben			
	n	†	%	n	†	%	W	Db/ DZ	E	I
II	75	-	-	70	16	22,85	100	-	-	<0,1 %
III	52	4	7,69	54	38	70,37	89	-	-	<0,1 %
V	50	-	-	50	23	46,0	100	-	-	<0,1 %
VI	49	1	2,04	51	23	45,09	95,4	-	-	<0,1 %
VII	47	2	4,26	50	30	60,0	92,9	-	-	<0,1 %
Summe	273	7	2,56	275	130	46,8	94,5	44,24/ 3,75	11,79	<0,1 %

Tabelle 6: Ergebnisse und statistische Angaben für die Versuche mit unspezifischer oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten Bifidusbakterien und intraperitonealer Infektionsbelastung mit virulenten E.coli 2380-Bakterien
(Erklärungen der Überschriften s. Tabelle 1, Seite 7)

Versuch Nr.	mit hitzeinaktivierten Bifidusbakterien immu- nisierte Mäuse			Kontrollen			statistische Angaben			
	n	†	%	n	†	%	W	Db/ DZ	E	I
II	75	24	32,0	70	16	22,85	-	-	-	-
III	50	23	46,0	54	38	70,37	34,6	-	-	-
V	50	22	44,0	50	23	46,0	4,3	-	-	-
VI	50	15	30,0	51	23	45,09	33,4	-	-	12 %
VII	49	23	46,92	50	30	60,0	21,8	-	-	-
Summe	274	107	39,05	275	130	46,8	16,3	7,75/ 8,6	0,9	4,5 %

Bei den Einzelversuchen liegen auch die Wirkungsindizes von dem vermehrungsfähigen Bifidusimpfstoff höher als die des hitzeinaktivierten. Außerdem zeigt bei dem hitzeinaktivierten kein Versuch statistische Signifikanz, während bei dem vermehrungsfähigen der III. Versuch hochsignifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1 % ist. Allerdings muß man auch bei den so schwankenden Ergebnissen diesen Versuch als "positiven Ausreißer" werten. In der Zusammenfassung aller Versuche mit vermehrungsfähigem Bifidusimpfstoff ist E dann nur 0,74 und die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 10 % (s. Tabelle 7).

Nach Immunisierung mit dem S.typhi murium-Impfstoff kann in Versuch III ein Schutz nachgewiesen werden, denn die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 0,1 %. Doch würde ich diesen Versuch, ebenso wie Versuch III bei der Immunisierung mit vermehrungsfähigen Bifidusbakterien, als "positiven Ausreißer" werten. Die Versuche II, V und VI liegen mit der Mortalität der Immuntiere über der der Kontrolltiere. Versuch VII zeigt in seinem Ergebnis statistische Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 3 %. In der Zusammenfassung aller Versuche ergibt sich für E 0,2 , und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 67,3 % ist zu berücksichtigen (s. Tabelle 8).

So kann man nur dem spezifischen E.coli-Impfstoff eine - sogar sehr gute - Schutzwirkung gegen eine intraperitoneale Infektion mit virulenten E.coli-Bakterien zusprechen.

Tabelle 7: Ergebnisse und statistische Angaben für die Versuche mit unspezifischer oraler Immunisierung mit vermehrungsfähigen Bifidusbakterien und intraperitonealer Infektionsbelastung mit virulenten E.coli 2380-Bakterien
(Erklärungen der Überschriften s. Tabelle 1, Seite 7)

Versuch Nr.	mit vermehrungsfähigen Bifidusbakterien immu- nisierte Mäuse			Kontrollen			statistische Angaben			
	n	†	%	n	†	%	W	Db/ DZ	E	I
II	76	34	44,73	70	16	22,85	-	-	-	-
III	41	5	12,0	54	38	70,37	82,9	-	-	< 0,1 %
V	50	22	44,0	50	23	46,0	4,3	-	-	-
VI	49	23	46,94	51	23	45,09	-	-	-	-
VII	47	22	46,86	50	30	60,0	25,2	-	-	-
Summe	263	106	40,28	275	130	46,8	13,9	6,52/ 8,8	0,74	10 %

Tabelle 8: Ergebnisse und statistische Angaben für die Versuche mit unspezifischer oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten *S. typhi* murium-Bakterien und intraperitonealer Infektionsbelastung mit virulenten *E. coli* 2380-Bakterien
(Erklärungen der Überschriften s. Tabelle 1, Seite 7)

Versuch Nr.	mit hitzeinaktivierten <i>S. typhi</i> -murium-Bakt. immunisierte Mäuse			Kontrollen			statistische Angaben			
	n	†	%	n	†	%	W	Db/ DZ	E	I
II	78	22	28,08	70	16	22,85	-	-	-	-
III	50	19	38,0	54	38	70,37	46,0	-	-	< 0,1 %
V	50	43	86,0	50	23	46,0	-	-	-	-
VI	49	23	46,74	51	23	45,09	-	-	-	-
VII	48	18	37,44	50	30	60,0	37,6	-	-	3 %
Summe	275	125	45,0	275	130	46,8	3,8	1,8/ 8,9	0,2	67,3 %

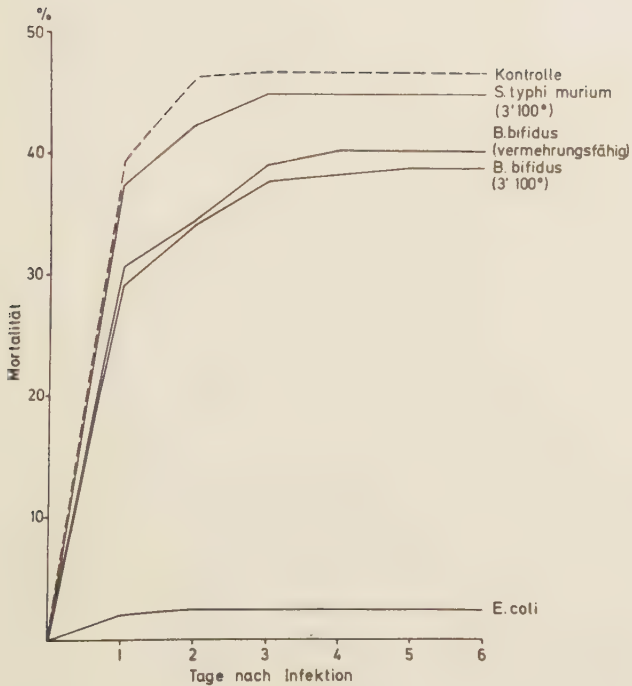


Abbildung 2

Anstieg der Mortalität nach intraperitonealer Infektion mit virulenten *E. coli* vom Stamm 2380 bei 273 mit hitzeinaktivierten *E. coli* 2380, 274 mit hitzeinaktivierten Bifidusbakterien, 263 mit vermehrungsfähigen Bifidusbakterien, 275 mit hitzeinaktivierten *S. typhi murium* oral geimpften Mäusen und 275 nicht geimpften Kontrollmäusen. Zusammenfassung der Versuche II, III und V - VII.

Tabelle 9: Statistische Zusammenfassung aller gewerteten Versuche

10 x Immunisierung, oral, mit	Infektion mit	Zahl der Mäuse absolut	Mortalität %	Wirkungsindex	Db/DZ	Echtheitsgrad	Irrtumswahrscheinlichkeit
1	2	3	4	5	6	7	8
S.typhi murium 3', 1000		318	93	29,2	31,8	13,6/ 8,0	1,7
Bifidus vermehrungsfähig		327	105	32,02	25,2	10,8/ 8,1	1,33
Bifidus hitzeinaktiv, 3', 1000	S.typhi murium, 1 x oral	327	116	35,38	17,4	7,44/ 8,2	0,9
E.coli 2380, 3', 1000		313	127	40,64	5,1	2,18/ 8,4	0,25
Kontrollen		301	129	42,82	-	-	-
E.coli 2380 3', 1000		273	7	2,56	94,5	44,24/ 3,75	11,79
Bifidus hitzeinaktiv, 3', 1000		274	107	39,05	16,3	7,75/ 8,6	0,9
Bifidus, vermehrungsfähig	E.coli 2380 virulent 1 x intraperitoneal	263	106	40,28	13,9	6,52/ 8,8	0,74
S.typhi murium 3', 1000		275	125	45,0	3,8	1,8/ 8,9	0,2
Kontrollen		275	130	46,8	-	-	-

D. Diskussion

In allen Versuchen wurde nur die orale Immunisierungsmethode benutzt. Dazu wurde unter optimalen Bedingungen der Impfstoff hergestellt. Die Hitzeinaktivierung erfolgte nämlich für drei Minuten bei 100°C (KORDES, 20). Es wurden der Impfrhythmus und die Dosierung gewählt, bei denen die beste Schutzwirkung erwartet wird (RAETTIG, 39). Dies sind die Verteilung der Gesamtantigenmenge auf 5 - 10 täglich wiederholte Gaben und die Einstellung des Keimgehaltes auf 10^9 - 10^{10} Keime/ml. So werden die Gründe für das Mißlingen eines Versuches kaum in diesem Bereich zu finden sein.

Nach der oralen Infektion mit virulenten *S.typhi murium* konnten drei der vier Impfstoffe einen Schutz aufweisen. Der homologe schützte am besten. Der gute Schutz dieses Impfstoffes ist außer an Tierversuchen auch schon in mannigfachen Feldversuchen angezeigt worden, so daß ich hier nicht näher darauf eingehen will.

Dann folgte der vermehrungsfähige Bifidusimpfstoff, der in seiner Schutzwirkung nahe an die des homologen heranreicht. Dem hitzeinaktivierten Bifidusimpfstoff kann nur ein geringer Schutzwert zugesprochen werden, da die Irrtumswahrscheinlichkeit gerade bei 5 % liegt. Die mit Bifidus- und *E.coli*-Impfstoff immunisierten Tiere sind alle mit einem heterologen Infektionsmaterial belastet worden: Bifidus schützt, *E.coli* nicht. Wann schützt ein unspezifischer Impfstoff, der auf oralem Wege verabreicht wird?

Allgemein wird ja nach oraler Immunisierung mindestens eine lokale in der Darmwand gelegene Abwehrkraft festgestellt (2, 6, 35, 45). ROSSETINI, LEVANON und RAETTIG (42) konnten nach Immunisierungen mit *S.typhi murium*, *E.coli* 2380 und *Sh.flexneri* am Gewebe des Dünndarms der Tiere Zellen aufzeigen, die im Kutantest (PCA) nachweisbare Reagine produzieren. Ob diese Reagine nun Stoffe sind, die das Tier gegen eine Infektion schützen, ist nicht sicher. Doch zeigten die oral immunisierten Tiere gegenüber der Infektion einen Schutz, und das Optimum des Schutzes stimmte mit dem Optimum des Reaginnachweises überein. GÜNTHER (7) sieht auch

unspezifische Schutzeffekte, die er allerdings nur für Immunisierung mit Salmonellen beschreibt. Diesen gegen pathogene Darmkeime gerichteten Schutz hat er ausschließlich nach oraler Infektionsbelastung beobachtet. Die Darmkeime brauchten mit dem oral verwendeten Immunisierungsstoff keine Antigengemeinschaft zu besitzen. JANDL (13) konnte in seinen Versuchen eine unspezifische lokale Darmimmunität sichern. Er immunisierte erfolgreich Mäuse mit E.coli zehnmal oral und infizierte einmal oral mit S.enteritidis, wie dies RAETTIG bereits beschrieben hatte (37). Wurde auch parenteral immunisiert, schützte die Immunisierung mit E.coli nicht mehr. TORIKATA und IMAIZUMI (48) konnten nach oraler Impfung mit E.coli beim Meerschweinchen im Preßsaft der Darmwand Opsonine nachweisen, die höher lagen als die des Bluteserums.

Andererseits fehlte bei mit Pertussis immunisierten und mit S. typhi murium oral infizierten Mäusen ein Impfschutz (37). FÜLLHAAS (6) zeigte, daß der Proteasen enthaltende Darmsaft auf die Intestinalantikörper einen schädigenden Einfluß ausübt. Als Intestinalantikörper bezeichnet er Immunglobuline vom IgA Typ. Diese sollen in Plasmazellen der Lamina Propria der Mucosa synthetisiert werden. Der Kopro- und Mucustiter steigt und fällt mit der An- und Abwesenheit des betreffenden Keimes. Bei Zugabe von Proteaseninhibitor an mit S.typhi murium immunisierte und mit dem homologen Stamm infizierte Mäuse konnte er eine Senkung der Mortalität gegenüber den Kontrollen feststellen.

Wo nun die Merkmale liegen, ob in der Darmwand nach oraler unspezifischer Immunisierung Antikörper gebildet werden und bei welcher Anzahl sie dann gegen eine heterologe Infektion zu schützen vermögen, ist durch die vorangegangenen Untersuchungen nicht klar.

Da JANDL (15) nicht angibt, welchen E.coli-Stamm er benutzt hat - wahrscheinlich keine Dyspepsiecoli, da er die verwendeten Coli-keime als Darmkeime und nicht als Dyspepsiecoli bezeichnet - kann sein positiver Versuchsausfall nicht direkt mit meinem negativen verglichen werden. Zudem infizierte er mit einem mit Infektionsmaterial getränkten Brodwürfel. Es ist schwierig, auf diese Weise die genaue Infektionsdosis zu verabreichen. Dem hält er entgegen,

daß mit der Infektionssonde leicht Schleimhautverletzungen auftreten, was dann einer parenteralen Infektion gleichkäme.

Vielleicht hängt der Impferfolg bei der unspezifischen oralen Immunisierung von der Pathogenität des Keimes ab. Ecoli 2380 in virulenter Form, oral zur Infektion gegeben, ruft zwar keine sichtbaren Krankheitszeichen hervor (23), das schließt aber nicht eine pathogene Wirkung aus. So würden die Tiere dann gerade in einem Stadium verminderter Resistenz infiziert werden. Dieser Faktor würde dann bei den apathogenen Bifidusbakterien wegfallen. Auch wird E.coli 2380 nur gering die Abwehrmechanismen in der Darmwand stimulieren, sondern hauptsächlich die spezifischen Antikörper, wie es auch LIETZ (23) zeigte und mein Ergebnis mit dem sehr guten Schutz nach homologer Infektion. Dies erklärt auch, warum der Bifidusimpfstoff gegen die heterologe orale Infektion mit S.typhi murium einen so guten Schutz zeigte. Er vermichte die in der Darmwand lokalisierten unspezifischen Abwehrmechanismen gut anzuregen. Und dies allein ist ja entscheidend bei einer unspezifischen Immunisierung gegen eine orale Infektion mit S.typhi murium.

HAENEL (8) schreibt der Darmflora Anregung zu unspezifischen Resistenzen des Wirtes zu, wie Stimulierung im RES, Erhöhung der Serum - Globuline, des Properdinspiegels sowie Clearance von Bakterien aus dem Blut und ihrer Verdauung durch Makrophagen. An keimfrei aufgezogenen Tieren sah er eine erheblich schwächer ausgebildete Darmwand. Auch SCHULER (46) schreibt der Intestinalflora bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der humoralen Abwehrfaktoren, etwa des Properdinsystems oder, im Sinne einer Antikörperschulung schließlich zur immunologischen Reife führend, einige Bedeutung zu. Ob dies nun im einzelnen für die Bifidusbakterien zutrifft, mag dahingestellt bleiben. Als sicher gilt aber, daß sie gegen eine orale Infektion mit S.typhi murium schützen konnten. Daß der vermehrungsfähige Bifidusimpfstoff besser schützte als der hitzeinaktivierte, war zu erwarten, da die Bakterien in ihrer antigenen Struktur nicht zerstört waren.

KINNE (17) immunisierte Mäuse mit verschiedenen Salmonellatypen, jeweils in vermehrungsfähiger und hitzeinaktivierter Form. In allen Versuchen schützt einheitlich der vermehrungsfähige besser. Auch ILLES (12) konnte das beobachten. Er meint, daß die gute immunisierende Wirkung eines Impfstoffes aus lebenden Bakterien nur damit zusammenhängt, daß diese eine größere Chance haben, mit immunologisch kompetenten Zellen im Organismus in Kontakt zu kommen als abgetötete Erreger.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine unspezifische Immunisierung mit nachfolgender oraler Infektion mit *S.typhi murium*-Bakterien einen hinreichenden Schutz gewähren kann. Dies hängt ab von

1. der Pathogenität des Keimes, der immunisieren soll,
2. der Fähigkeit dieses Keimes, unspezifische Abwehrmechanismen in der Darmwand zu stimulieren.

Die Ergebnisse nach oraler Immunisierung mit *E.coli* 2380 und homologer intraperitonealer Infektion waren hochsignifikant mit einem Wirkungsindex von 94,5 und einer statistischen Echtheit von 11,79. Dieser Schutz kann wohl kaum nur in der Darmwand lokalisiert sein. Die Versuchstiere starben nur an den beiden ersten Tagen nach der Infektion. In dieser kurzen Zeitspanne wird ein isolierter Schutz in der Darmwand diese massive intraperitoneale Infektion nicht beherrschen können. Wahrscheinlich wird die durch die Immunisierung mit *E.coli* 2380 verursachte Gewebeimmunität sowieso klein sein, wie ich es schon weiter oben erwähnte. LIETZ (23) nimmt an, daß das Antigen auf bestimmte vorbereitete Zellen der Darmschleimhaut einen Reiz ausübt, der diese zur Bildung von spezifischen Antikörpern anregt. Die nun können mit dem Blut abtransportiert werden und auf diese Weise überall hingelangen. Es werden regelmäßig humorale Antikörper gefunden:

1. bei Anwendung spezieller serologischer Meßmethoden (32),
2. nach genügend hoher und langer Immunisierungs-dosis.

Bei LIETZ (23) waren nach der Immunisierung gewöhnlich niedrige

oder gar keine Antikörpertiter gegen den Dyspensiecoli 2380 vorhanden. Aber sofort nach der Infektion war ein steiler Titeranstieg zu sehen. Dazu muß gesagt werden, daß "nicht die Höhe des Antikörpertiters im strömenden Blut zu irgendeiner Zeit, sondern ein Anstieg kurz nach einer homologen Infektion ein Gradmesser ist für die Bereitschaft der immunkompetenten Zellen zur Antikörperbildung und damit für einen Teil der belastbaren Immunität" (RAETTIG und BUSE, 40).

Von guten Ergebnissen bei der spezifischen Immunisierung mit E.coli 2380 berichteten schon PIRINGER (34), MOCHMANN u.a. (28), OCKLITZ u.a. (30) und LIETZ u. RAETTIG (24). Die Ergebnisse von MOCHMANN, LIETZ und RAETTIG und mir sind in Tabelle 10 (s. Seite 26) zusammengestellt.

Dagegen konnte ein Schutz nach unspezifischer Immunisierung entweder gar nicht oder nur als zweifelhaft angesehen werden. Einen deutlichen Schutz konnte in meinen Versuchen kein unspezifischer Impfstoff herstellen. Zwar liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit nur bei 4,5%, E ist allerdings nur 0,9, doch sind die Einzelversuche in ihren Ergebnissen recht schwankend. Deswegen liegt hier wahrscheinlich der hitzeinaktivierte in seiner Schutzwirkung besser als der vermehrungsfähige. Auch bei diesem pendeln die Einzelversuche extrem, vom negativen zum positiven "Ausreißer". Mit dem S.typhi murium-Impfstoff verhält es sich nicht anders. In drei Versuchen liegt die Mortalität der Immuntiere über der der Kontrolltiere, in zwei Versuchen ist ein signifikanter Schutz vorhanden. Die Versuche sind in ihren Ergebnissen zu schwankend, als daß man eine klare Aussage machen könnte. Man müßte eine größere Reihe von Versuchen machen, um zu einem deutlicheren Ergebnis zu kommen.

Auch bei LIETZ (23) taucht ein ähnliches Problem auf bei der unspezifischen Immunisierung. Die Versuche mit der geringsten Mortalität der Kontrolltiere zeigen den besten Schutz. Er führt das auf die geringe Infektionsbelastung zurück. Bei meinen Versuchen ist es genau umgekehrt. Wenn die Infektionsbelastung am stärksten ist, d.h. die Mortalitätsrate der Kontrollen am höchsten, zeigt sich der beste Schutz.

MOCHMANN (29) konnte in seinen Versuchen mit unspezifischer

Tabelle 10: Ergebnisse und statistische Auswertung von drei Autoren zu Versuchen mit spezifischer oraler Immunisierung mit *E. coli* 2380 und intraperitonealer Infektion mit dem homologen Keim. (E % = Endmortalität in %; W = Wirkungsindex; E = Grad der statistischen Echtheit)

Autor	Immunisierungs- dosis von DG 2380	Belastungs- dosis von DG 2380	Immuniere lebend/ tot		Kontrollen lebend/ tot		W	E
				E %		E %		
Mochmann	$15 \cdot 10^9$ Keime/ 0,5 ml	25 - 70 Mill. Keime/0,5 ml	42/4	8,7	8/38	82,6	89,5	2,7
Lietz und Raettig	$3,1 \cdot 10^9$ Keime/ 0,5 ml	10^9 Keime/ 0,4 ml	234/60	20,4	67/227	77,2	73,6	5,2
Müller	10^9 Keime/ml	$3 \cdot 10^8$ Keime/ 0,1 ml	266/7	2,56	145/ 130	46,8	94,5	11,79

Immunisierung lediglich bei "Normalcoli" einen schwachen Schutzeffekt sehen. Alle anderen Colitypen, die keine Antigengemeinschaft mit dem infizierenden Dyspepsiecoli 2380 hatten, zeigten keinen. Die Ergebnisse von Mochmann, Lietz u. Raettig und mir zur unspezifischen Immunisierung und der Infektionsbelastung mit E.coli 2380 sind in Tabelle 11 zusammengestellt (s. Seite 28).

Man muß bei den E.coli 2380 - Belastungsversuchen vor allem berücksichtigen, daß ein atypischer Infektionsweg gewählt ist, der eine weitaus größere Streßwirkung und viel akutere Krankheitszeichen durch die ausgelöste Peritonitis zeigt als eine Enteritis es tun würde (25, 28, 29).

Bei den unspezifischen Immunisierungen und der nachfolgenden Infektion mit E.coli 2380 steht hauptsächlich die Darmschleimhaut als lokaler Schutzmechanismus zur Verfügung. LIETZ und RAETTIG (24) und auch MOCHMANN (28) konnten durch Bestimmung der Antikörpertiter erkennen, daß es zur Bildung von humoralen Antikörpern gar nicht oder nur sehr verlangsamt kommt. Der spezifische Impfstoff hat den Vorteil, daß er erstens einen lokalen Schutz, hier in der Schleimhaut des Darmes, verleiht, und zweitens einen in spezifischen anderen Systemen. Daraus resultiert dann der gute Schutz.

Welche Bedeutung haben die Ergebnisse für den Menschen? Beim Säugling nimmt der Vorrat an mütterlichen Antikörpern immer mehr ab, während er sein eigenes Abwehrsystem aufbaut. Die Empfänglichkeit für Lokalinfektionen ist bei ihm ausgeprägter als in der späteren Zeit der Entwicklung. Man sieht häufiger Staphylokokkeninfekte der Haut und Coliinfektionen des Darmkanals (25). Von den meisten Autoren wird E.coli 2380 mit der Antigenformel O 111 : B4 : H2 als der häufigste Erreger von Säuglingsdyspepsien beschrieben. Außerdem ist die Vielfalt der Erreger von Krankenhausinfektionen im Bereich der Pädiatrie groß. Durch diese Infektionen werden nur Patienten mit unzureichend entwickeltem Abwehrmechanismus betroffen. Die Verbreitung der Erreger erfolgt über Sekrete des Respirationstraktes, Ausscheidungen der Verdauungs- und Harnwege sowie Absonderungen der Haut (16).

Tabelle 11: Ergebnisse und statistische Auswertung von drei Autoren zu Versuchen mit unspezifischer oraler Immunisierung und intraperitonealer Infektion mit *E. coli* 2380 (Σ % = Endmortalität in %; W = Wirkungsindex; E = Grad der statistischen Echtheit)

Autor	Antigen	Immunisierungs- dosis	Belastungs- dosis von DC 2380	Immuntiere lebend/ tot Σ %		Kontrollen lebend/ tot Σ %		W	E
Mochmann	Na-Desoxy- Extrakt aus DC 055	$2 \cdot 10^9$ K./ 0,5 ml	$20-38 \cdot 10^6$ K./0,5 ml	8/111	93,3	6/113	95	1,8	0,13
Mochmann	Na-Desoxy- Extrakt aus O 127	$2 \cdot 10^9$ K./ 0,5 ml	$20-24 \cdot 10^6$ K./0,5 ml	8/55	87,3	4/59	93,7	6,8	0,3
Mochmann	Na-Desoxy- Extrakt aus O 26	$2 \cdot 10^9$ K./ 0,5 ml	$24 \cdot 10^6$ K./ 0,5 ml	3/22	88,0	0/25	100	12,0	0,35
Mochmann	Na-Desoxy- Extrakt aus "Normalcoli"	$2 \cdot 10^9$ K./ 0,5 ml	$18-38 \cdot 10^6$ K./0,5 ml	34/88	72,1	12/111	90,2	20,1	1,17
Lietz u. Raettig	inaktivierte DC O 125	$5 \cdot 10^{11}$ K./ ml	10^9 K./ 0,1 ml	83/ 117	58,5	47/ 155	76,7	23,8	1,27
Müller	inakt.S. typhi mur.	10^9 Keime/ ml	$3 \cdot 10^8$ K./ 0,1 ml	150/ 125	45,0	145/ 130	46,8	3,8	0,2
Müller	Bif.Bakt. verm.fig.	10^9 Keime/ ml	$3 \cdot 10^8$ K./ 0,1 ml	157/ 106	40,28	145/ 130	46,8	13,9	0,74
Müller	Bif.Bakt. hitzein- aktiviert	10^9 Keime/ ml	$3 \cdot 10^8$ K./ 0,1 ml	167/ 107	39,05	145/ 130	46,8	16,3	0,9

SCHREIBER (44) hat an mehr als 1100 Kindern einen polyvalenten Impfstoff mit Dyspepsiecolikeimen von den Stämmen O 26, O 55, O 111 und O 128 unternommen. Die Kinder bekamen ihn an fünf aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Einen spezifischen Impfschutz konnte er nicht klar zeigen, da nur wenige Kinder an einer DC bedingten Dyspepsie litten. Eine unspezifische Schutzwirkung dagegen war deutlich. Es wurde die Rezidivhäufigkeit gesenkt und ein Dauerausscheidertum verhindert.

Es wäre angebracht, Feldversuche mit einem Bifidusimpfstoff an Kindern und Säuglingen zu unternehmen. An diesem apathogenen und daher unschädlichen Immunisierungsmaterial könnte man dann noch eingehender die mögliche Anregung von Abwehrmechanismen prüfen. Denn neben seinen in der Einleitung aufgewählten therapeutischen Eigenschaften ist eine - wie hier in den Versuchen gezeigt wurde - Stimulierung immunkompetenter Zellen, wenigstens in der Darmschleimhaut, wahrscheinlich. Weiterhin wäre an solch einem Feldversuch zu testen, inwieweit diese wahrscheinliche Stimulierung mit einer Substitutionstherapie (s. Einleitung) identisch ist.

Mit diesem Impfstoff könnte man dann auch dem mangelhaften immunologischen Training, das immer mehr zu verkümmern scheint, entgegentreten (38). Es würde einmal eine Stärkung der Grundimmunität, die unspezifischer Natur ist, bedeuten, und zum anderen noch eine Unterstützung des noch mangelhaften Abwehrmechanismus des Säuglings sein. Zudem hat die orale Immunisierung gegenüber der parenteralen viele Vorteile, wie das BREUEL (2) ausführlich beschrieben hat.

Da für den Bifidusimpfstoff eine Massengewinnung des schwer züchtbaren grampositiven Anaerobiers nötig und die Züchtung der Reinkultur sehr aufwendig wäre, empfiehlt KLUDAS (18) die Züchtung gemeinsam mit E.coli. Diese zeigen zusammen ein Ammenwachstum. E.coli enthält Bifidus fördernde Substanzen und kann die Spaltprodukte der Bifiduskeime (Milchsäure) weiter abbauen (10). So könnte man die ja schon erfolgreich in Feldversuchen eingesetzten DC-Keime mit Bifidusbakterien zu einem Impfstoff kombinieren, wie es zu einer Substitutionstherapie mit dem Präparat Omniflora schon VLCEK u. KNEIEL taten (50).

E. Zusammenfassung

An 3715 Mäusen wurde der Impfschutz von vier verschiedenen oral verabreichten Impfstoffen untersucht. Als Infektionserreger wurde einmal Salmonella typhi murium oral und zum anderen Escherichia coli 2380 (ROWLEY) intraperitoneal angewendet.

1. Die spezifischen Impfstoffe S.typhi murium und E.coli 2380 schützten gegen die homologe Infektion sehr gut.
2. Der vermehrungsfähige Bifidusimpfstoff schützte gegen die orale S.typhi murium-Infektion gut, aber nicht gegen die intraperitoneale E.coli-Infektion.
3. Der hitzeinaktivierte Bifidusimpfstoff schützte gegen beide Infektionserreger minimal.
4. Weder E.coli vermochte gegen die heterologe S.typhi murium-Infektion noch S. typhi murium gegen die heterologe E.coli-Infektion zu schützen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse und ihre Bedeutung für den Menschen werden diskutiert.

F. Literatur

- 1 ADAM, A. Die Entstehung der Bifidusvegetation (Jb. d. Kinderhkl. 110, 186 - 204 (1925))
- 2 BREUEL, H.-P. Lokale Immunisierung mit nicht vermehrungs-fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen (Inaugural-Dissertation, FU Berlin 1969)
- 3 BOVENTER, K. Bacterium bifidum und seine Bedeutung (Erg. Hyg. 26, 193, 1949)
- 4 FELDHEIM, G. Zur Definition der "normalen" und "gestörten" Darmflora der Erwachsenen (Eubiose - Dysbiose) (Med. Welt 134, 1961)
- 5 FOX, A.E. Isolation of a Soluble Resistance - Enhacing Factor from Mycobacterium palei (J.Bact. 92, 285 - 290; 1966)
- 6 FÜLLHAAS, J. Vorkommen und Rolle von Intestinalantikörpern (Inaugural-Dissertation, Kiel, 1969)
- 7 GÜNTHER, O. Bemerkungen zur Typhusschutzimpfung aus immuno-logischer Sicht (Arbeiten a.d. Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt/M., Heft 65, S.1-14, 1970)
- 8 HAENEL, H. Neuere Auffassungen zur Zusammensetzung, Wirkung und Bedeutung der intestinalen Mikroflora (Int. 10, 279-283, 1969)
- 9 HEYNEN, U. Schutztherapie mit Bacterium bifidum (Zschr. f. Allgemeinm., Landarzt; 27, 1285-1287, 1969)
- 10 HOFFMANN, K. Bakterielle Besiedlung des menschlichen Darmes (Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, 1966)
- 11 HOFFMANN, K. Über die Stuhlflora von Frühgeborenen im Klinik-milieu bei Ernährung mit roher und gekochter Frauenmilch (Zschr.f. Kinderhkl., 81, 367-378, 1958)

- 12 ILLES, J. Zur aktiven Schutzimpfung gegen die Salmonellosen (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 202, 364-368, 1967)
- 13 JANDL, G. Experimentielle Untersuchungen zum Mechanismus der oralen Typhus-Immunisierung (I.Mitt. Z.f. Hyg. 151, 34, 1965)
- 14 JANDL, G. Probleme des Immunmechanismus bei der oralen Typhus-Immunisierung (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 198, 179, 1965)
- 15 JANDL, G. Experimentielle Untersuchungen zum Mechanismus der oralen Typhus-Immunisierung (II.Mitt. Z.med. Mikrob.u.Imm. 152, 211-215, 1966)
- 16 KIENITZ, M. Pädiatrische Aspekte der Krankenhausinfektion (Mschr. Kinderhkl. 116, 6, 361, 355, 1968)
- 17 KINNE, E. Tierversuche zur oralen Impfung gegen menschenpathogene, Enteritis erregende Salmonellen (Inaugural-Dissertation FU Berlin, 1967)
- 18 KLUDAS, M. Züchtung von Laktobazillus bifidus in und auf einfachen Nährmedien (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 74, 71-74, 1959)
- 19 KOLLER, S. Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen (Verlag Steinkopp, Dresden u. Leipzig 1940)
- 20 KORDES, B. Orale Immunisierung von Mäusen mit Impfstoffen aus physikalisch inaktivierten S.typhi murium Bakterien (Inaugural-Dissertation FU Berlin 1969)
- 21 KORDES, I. Vergleichende Tierexperimente mit Impfstoffen aus chemisch inaktivierten S.typhi murium Bakterien bei oraler und subkutaner Immunisierung (Inaugural-Dissertation FU Berlin, 1969)
- 22 KUNDRATITZ, K. Durch pathogene Colistämme bedingte Enteritiden im Säuglingsalter und deren Behandlung (Österr.Z. f. Kinderhkl. 8, 305-325. 1953)

- 23 LIETZ, B. Orale Impfung mit inaktivierten Dyspepsie-
coli-Bakterien bei Mensch und Tier (Inaugural-
Dissertation, FU Berlin, 1969)
- 24 LIETZ, B. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen
RAETTIG, H. Mikroorganismen oder ihren Antigenen; V.
Mitt.: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen
Dyspepsiecoli-Infektionen (Zbl.f.Bakt. I.Orig.
204, 543-554, 1967)
- 25 LOEBLICH, E. Verschiedene Mechanismen der Provokation einer
Infektion durch Schutzimpfung (Inaugural-
Dissertation, FU Berlin, 1966)
- 26 MAYER, J.B. Möglichkeiten einer physiologischen antibiotischen
Therapie beim Säugling mit Bacterium
bifidum (Lactobacillus bifidus) (Mschr. f.
Kinderhkl. 114, 67-73, 1966)
- 27 MITSUOKA, T. Vergleichende Untersuchungen über die Bifibak-
terien aus dem Verdauungstrakt von Menschen
und Tieren (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 210, 52-64,
1969)
- 28 MOCHMANN, H. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten
OCKLITZ, H.W. einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-
desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsie-coli-Stäm-
SCHMIDT, E.F. men; III. Mitt.: Die Schutzwirkung des Extrak-
HERING, L. tes im aktiven Mäuseschutzversuch (Zbl.f.Bakt.
MILLECK, J. I.Orig. 203, 314, 1967)
- 29 MOCHMANN, H. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten
OCKLITZ, H.W. einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-
HERING, L. desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsie-coli-Stäm-
SCHMIDT, E.F. men; V.Mitt.: Die Gruppenspezifität der
RICHTER, U. Schutzwirkung und der Schutzeffekt einer bi-
valenten Immunisierung im aktiven Mäuseschutz-
versuch (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 206, 63-71, 1968)

- 30 MOCHMANN, H.
OCKLITZ, H.W.
MILLECK, J.
HERING, L.
SCHMIDT, E.F. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsie-coli-Stämmen; IV.Mitt.: Der Schutzeffekt verschiedener Zellpräparationen aus Dyspepsiecoli-Keimen im Vergleich zur Schutzwirkung des Na-desoxycholat-Extraktes (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 205, 502-509, 1967)
- 31 OCKLITZ, H.W.
MOCHMANN, H.
SCHMIDT, E.F. Die Prophylaxe der Dyspepsiecoli-Infektion (Dtsch. Gesundheitsw. 26, 1226-1235, 1968)
- 32 OCKLITZ, H.W.
MOCHMANN, H.
HERING, L.
SCHMIDT, E.F.
RICHTER, U. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natrium-desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsie-coli-Stämmen; VIII.Mitt.: Serumantikörper in der gemischten Hämadsorptionsreaktion nach FAGREUS bei immunisierten und belasteten Mäusen (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 209, 161-168, 1969)
- 33 PETUELY, F. Der Bifidusfaktor (Dt.med.Wchschr. 82, 1957)
- 34 PIRINGER, W.A. Orale Immunisierung weißer Mäuse durch Dyspepsiecoli (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 196, 463-468, 1965)
- 35 RAETTIG, H. Die lokale Immunisierung mit inaktivierten Antigenen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr) (Zbl.f. Bakt. I.Ref. 183, 1, 1962)
- 36 RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen; 1.Mitt.: Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion (Zbl. f.Bakt. I.Orig. 193, 398, 1964)
- 37 RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen;

- 2.Mitt.: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Maus (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 197, 368-388. 1964)
- 38 RAETTIG, H. Indikationen und Kontraindikationen bei aktiven Schutzimpfungen (Internist 7, 65, 1966)
- 39 RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen; 3.Mitt.: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 203, 478, 1967)
- 40 RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen; BUSE, A. 4.Mitt.: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis (Zbl. f.Bakt. I.Orig. 204, 221, 1967)
- 41 REUTER, G. Zur Beeinflussbarkeit der Darmflora des Menschen im Säuglings- und Erwachsenenalter durch die Nahrung, insbesondere auch durch ihren Gehalt an Laktobazillen (Med. u. Ernähr. 4, 188, 1963)
- 42 ROSSETINI, S. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen; LEVANON, Y. 7. Mitt.: Nachweis von Reaginen im Serum und in Dünndarmzellen oral geimpfter Laboratoriumstiere (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 208, 16-26, 1968) RAETTIG, H.
- 43 SACHS, L. Statistische Auswertungsmethoden (Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1969, 2. Aufl., 341-345)
- 44 SCHREIBER, K.A. Ein Feldversuch zur oralen Impfung mit inaktivierten Dyspepsiecolibakterien im Säuglings- und Kleinkindesalter (Inaugural-Dissertation, FU Berlin, 1968)

- 45 SCHMUDDE, R. Vergleichende orale, nasale und rektale Impfung von Mäusen mit inaktivierten *S.typhimurium*-Bakterien mit und ohne Dimethylsulfoxyd-Zugabe (Inaugural-Dissertation, FU Berlin, 1968)
- 46 SCHULER, R. *L.bifidus*: Geschichtlicher Überblick, ernährungsphysiologische und therapeutische Aspekte, Morphologie, kulturelle Eigenschaften und Taxonomie (Milchwissenschaft 23, 6, 9, 10, 1968)
- 47 SITTLER, P. Beiträge zur Bakteriologie des Säuglingsdarmes (Zbl.f.Bakt. I.Orig. 47, 14 und 145, 1968)
- 48 TORIKATA, R.
IMAIZUMI, M. Zum Unterschiede zwischen der Infektions- und der oralen Immunisierung (Z. Immunforsch. 94, 342, 1938)
- 49 TISSIER Sur la flora intestinale (Inaugural-Dissertation, Paris, 1900)
- 50 VLCEK, A.
KNEIFL, J. Über Versuche zur Normalisierung einer gestörten Darmflora beim Säugling; II.Mitt.: Klinische Erfahrungen mit Omniflora bei Frühgeborenen (Zschr.f.Kinderhkl. 89, 155-159, 1964)

Herrn Professor Dr. med. Hansjürgen RAETTIG danke ich
für die Überlassung des Themas und die freundliche
Unterstützung bei der Arbeit.

Weiter danke ich allen Mitarbeitern seiner Abteilung,
besonders der Medizinisch-Technischen Assistentin
Frau Gisela DEAN, geb. Müller.

Der MED-Fabrik, Berlin, danke ich für die Überlassung
des Bifidus-Impfstoffes.

LEBENS LAUF

Am 14.4.1947 wurde ich als drittes Kind des Pfarrers Johannes Müller und seiner Ehefrau Elisabeth geb.Möhring in Berlin geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Grundschule. Anschließend ging ich dann auf das Evangelische Gymnasium zum Grauen Kloster. Dort legte ich 1966 die Reifeprüfung ab.

Im Sommer 1966 begann ich das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin. Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich im Sommersemester 1968.

Seit Mai 1971 bin ich mit Ingomar Westendorf verheiratet.

Am 11.2.1972 bestand ich das medizinische Staatsexamen. Vom 1.4.1972 an werde ich als Medizinalassistentin im Jüdischen Krankenhaus in Berlin tätig sein.

